

エマメクチン安息香酸塩試験法（畜水産物）

1. 分析対象化合物

エマメクチン B1a

8,9-Z-エマメクチン B1a

2. 適用食品

畜水産物

3. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）

4. 試薬、試液

次に示すもの以外は、総則の3に示すものを用いる。

エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品はエマメクチン B1a 安息香酸塩 92%以上を含む。

8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品は 8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩 80%以上を含む。

5. 試験溶液の調製

1) 抽出

① 筋肉、脂肪、肝臓、乳、卵及び魚介類の場合

試料 10.0 g にアセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物にアセトン 25 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、40°C以下で約 1 mL に濃縮する。これに 20 w/v%塩化ナトリウム溶液 10 mL 及びアンモニア水 1 mL を加え、酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物に n-ヘキサン 10 mL を加え、n-ヘキサン飽和アセトニトリル 10 mL ずつで 2 回振とう抽出する。抽出液を合わせ 40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び水（1：1）混液 10 mL 及びアンモニア水 0.5 mL を加えて溶かす。

② はちみつの場合

試料 10.0 g に水 5 mL を加えて溶かす。これにアセトン 50 mL を加え、ホモジナイズした後、吸引ろ過する。ろ紙上の残留物に水 5 mL を加えて溶かし、アセトン 25 mL を加えてホモジナイズした後、上記と同様にろ過する。得られたろ液を合わせ、アセトンを加えて正確に 100 mL とする。この溶液から正確に 10 mL を分取し、40°C以下で約 1 mL に濃縮する。これに 20 w/v%塩化ナトリウム溶液 10 mL 及びアンモニア水 1 mL を加え、酢酸エチル 10 mL ずつで 2 回振とう抽出する。抽出液を合わせ、40°C以下で濃縮し、溶媒を除去する。この残留物にアセトニトリル及び水（1：1）混液 10 mL 及びアンモニア水 0.5 mL を加えて溶かす。

2) 精製

スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラム (500 mg) にアセトニトリル及び水各 10 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。このカラムに 1) で得られた溶液を注入した後、アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液 10 mL を注入し、流出液は捨てる。次いで、2 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 5 mL を注入し、溶出液を採り、水で正確に 10 mL としたものを試験溶液とする。

6. 検量線の作成

エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品及び 8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品をそれぞれアセトンに溶かして標準原液を調製する。各標準原液を適宜混合して 1 vol%ギ酸含有アセトニトリル及び水 (1 : 1) 混液で希釈した溶液を数点調製し、それぞれ LC-MS/MS に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中 0.0005 mg/kg (エマメクチン安息香酸塩換算) に相当する試験溶液中濃度は各化合物 0.00005 mg/L (エマメクチン安息香酸塩換算) である。

7. 定量

試験溶液を LC-MS/MS に注入し、6. の検量線でエマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a の各含量を求め、次式によりエマメクチン安息香酸塩の含量を求める。

$$\text{エマメクチン安息香酸塩の含量 (ppm)} = A \times 1.138 + B \times 1.138$$

A : エマメクチン B1a の含量 (ppm)

B : 8,9-Z-エマメクチン B1a の含量 (ppm)

8. 確認試験

LC-MS/MS により確認する。

9. 測定条件

(例)

カラム : オクタデシルシリル化シリカゲル 内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3.5 μm

カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

移動相 : 0.02 vol%ギ酸及び 0.02 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液 (1 : 1) 混液で 0.5 分間保持した後、(1 : 9) までの濃度勾配を 9.5 分間で行い、(1 : 9) で 5 分間保持する。

イオン化モード : ESI (+)

主なイオン (m/z) :

エマメクチン B1a プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158、82

8,9-Z-エマメクチン B1a プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158、82

注入量 : 5 μL

保持時間の目安 : エマメクチン B1a 5 分

8,9-Z-エマメクチン B1a 6 分

10. 定量限界

各化合物 0.0005 mg/kg (エマメクチン安息香酸塩換算)

11. 留意事項

1) 試験法の概要

エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a を試料からアセトンで抽出し、アンモニア塩基性条件下で酢酸エチルに転溶した後、アセトニトリル/ヘキサン分配で脱脂 (はちみつでは省略) する。スチレンジビニルベンゼン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MS で定量及び確認する方法である。なお、エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a のそれぞれについて定量を行い、エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a の含量にそれぞれ換算係数を乗じてエマメクチン安息香酸塩含量に換算し、これらの和を分析値とする。

2) 注意点

- ① エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a の LC-MS/MS 測定で、試験法開発時に使用したイオンを以下に示す。

エマメクチン B1a

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 82

8,9-Z-エマメクチン B1a

定量イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 158

定性イオン (m/z) : プリカーサーイオン 887、プロダクトイオン 82

- ② エマメクチン B1a 及び 8,9-Z-エマメクチン B1a はガラスに吸着する場合がありますので、傷がついたものや表面が劣化したガラス器具を使用しないこと。
- ③ エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品については、試験法開発時に入手可能であった標準品の純度規格が 92%以上であったため、4. 試薬、試液では、「エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品はエマメクチン B1a 安息香酸塩 92%以上を含む」とされたが、入手可能な場合には純度 95%以上の標準品を試験に用いるのが望ましい。また、8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品については、試験法開発時に入手可能であった標準品の純度規格が 80%以上であったため、4. 試薬、試液では、「8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩標準品 本品は 8,9-Z-エマメクチン B1a 安息香酸塩 80%以上を含む」とされたが、入手可能な場合には純度 95%以上の標準品を試験に用いるのが望ましい。
- ④ 試験法開発時に検討した食品：牛の筋肉、牛の脂肪、牛の肝臓、牛乳、鶏卵、はちみつ (そば蜜)、うなぎ、しじみ

12. 参考文献

なし

13. 類型

C